with rumen bacteria and incubated for 3 days.

It is observed that *Infusoria* are in an actively motile state and have frequent fission.

Infusoria can not survive at various concentrations of the clover Juice in the absence of the other essential factors.

These effects of fresh white clover leaves on *Infusoria* cultures are not due to their inorganic substances.

When the fresh clover leaves are heated at 100° for 30 minutes, they do not forfeit their properties. So, it may be assumed that the effective factor of the clover leaves is a thermostable one. The same effective factor also exists in green peas and spinach leaves.

家蚕の Tryptophan 代謝について (其の 1)*

稲 神 馨 (熊本県蚕業試験場)

昭和 30 年 8 月 6 日 受 理

On the Tryptophan Metabolism of the Silkworm. (1)

By Kaoru INAGAMI (Kumamoto Prefectural Sericultural
Experiment Station)

家蚕のトリプトファン代謝については吉川⁽¹⁾が白卵系の突然変異を用いて, tryptophan—kynurenine—hydroxy—kynurenine—pigment の経路を明らかにした。その後, 平田, 吉川等⁽²⁾は卵が孵化するさい anthranilylglycine が生成されるとし, 市原⁽³⁾は xanthuren 酸は蚕蛹中に見出されなかつたと報告している。最近 BUTENANDT⁽⁴⁾は kynurine を蚕蛹中に見出している。

蚕のトリプトファン代謝については以上の報告をみるのみで, 代謝の全貌は未だ明らかにされていない。このことは蚕以外の昆虫にもいえることで, 哺乳動物及び微生物のトリプトファン代謝がかなりはつきりわかっているのに対し, 昆虫のそれは未だ明確にされていない。哺乳動物及び微生物の代謝とどのように異なっており, またそれらにない新しい代謝経路があるかどうかなど, 興味ある問題が知られないままになっている。

そこで著者はトリプトファン代謝に関係を持つ第 1 白卵, 第 2 白卵及び著者の見出した赤赤⁽⁵⁾等の蚕の突然変異を用いて蚕のトリプトファン代謝を追究し, その大要を明らかにしたので, ここに報告する。

供 試 材 料

供試した蚕の突然変異は第 1 白卵 (w_1), 第 2 白卵 (w_2), 赤赤 (rb) 及び正常系である。 w_1 は kynurenine から 3-hydroxykynurenine (以下 OH-kynu と記す) への代謝が阻害されているもの⁽¹⁾, w_2 は OH-kynu から色素への代謝が阻害されているもの⁽¹⁾, rb は kynurenine から anthranil 酸及び OH-kynu から 3-hydroxyanthranil 酸 (以下 OH-anthranil酸と記す) への代謝が阻害されているものと考えられるもの⁽⁶⁾。

実験結果及び考察

ペーパークロマトグラフによる蛹尿中の Tryptophan 代謝物質の検索

トリプトファン代謝物質が最も明瞭にみられる化蛾直前の蛹の尿 (直腸内容物) を供試した。尿を 80% メタノールで抽出し, 濃縮してペーパークロマトグラフ (以下 PC と記す) にかけた。濾紙は東洋濾紙 No. 51

Table 1. Paper Chromatography of Tryptophan Metabolites in Urine of Various Types of Silkworm (Solvent-Buthanol : Acetic acid : H₂O=4:1.5)

Spot	R_F	Normal	rb	w_1	w_2
A	0.08	±	+	—	±
B	0.15	±	+	—	±
C	0.38	+	卅	—	+
D	0.42	+	卅	卅	+
E	0.48	+	+	—	+
F	0.55	卅	—	—	卅
G	0.78	卅	—	卅	卅
H	0.80	+	+	—	+
I	0.82	卅	—	—	卅
J	0.88	+	—	—	+
K	0.92	±	—	+	±

試作品を用いた。No. 50, 52 は濾紙自体が紫の螢光を有するので, 微量の螢光物質の検出には適当でない。また濾紙に極微量含まれる Fe, Cu が R_F 値及び螢光を変える場合がみられたので (xanthuren 酸), この実験には全て No. 51 を用いた。溶媒は主としてブタノール・醋酸・水 (4:1:5), 5% 醋酸ソーダ液を用いた。

螢光並びに各種の呈色反応により多数のスポットが見出されたが, w_1 , w_2 , rb 及び正常系で含量に差が

* この報告は著者の「家蚕色素の生成に関する遺伝生化学的研究」の第 12 報をなすものである。

Table 2. Summary of R_F and Colour Reaction.

Spot	R_F		Fluorescence	Ninhydrin	EHRlich's reagent	PAULY's reagent	Probable identity
	Butanol-Acetic acid	5% Na Acetate					
A	0.08	flow	yellow green	reddish purple	pink after 1 hr.	—	Glucuronide of 30 K
B	0.15	flow	yellow green	reddish purple	"	—	Sulphate of 30 K
C	0.38	0.42	yellow green	reddish purple	pink	brown	30 K (3-Hydroxykynurenine)
D	0.42	0.68	blue green	purple	orange	—	Kynurenine
E	0.48	0.45	yellow green	—	—	red	Xanthurenic acid
F	0.55	0.43	yellow blue	—	—	—	F
G	0.78	0.80	purple	—	yellow	—	Anthranilylglycine
H	0.80	0.40	yellow	—	—	red	4,8-Dihydroxyquinoline
I	0.82	0.47	pale blue	—	—	—	I
J	0.88	0.65	blue purple	—	yellow	brown	3-Hydroxyanthranilic acid
K	0.92	0.64	purple	—	yellow	—	Anthranilic acid
L	0.58	0.32	pale blue	—	blue after 2 hrs.	—	L

Fig. 1. Chromatogram of Urine obtained from Normal Type.

Table 3. Colours produced on Paper by Reaction between Reference Substances and EHRlich's Reagent.

Substance	Immediate colour	Colour after 2 hr.	Colour after 24 hr.
Tryptophan	—	Violet	Green
Indole	Violet	Red	Red
Indolylpropionic acid	—	Blue	Blue
Indolylacetic acid	—	Blue	Blue
Kynurenine	Orange	Orange	Orange
Hydroxykynurenine	Pink	Pink	Pink
Anthranilic acid	Yellow	Yellow	Yellow
Hydroxyanthranilic acid	Yellow	Yellow	Yellow

nilylglycine の同定

Table 1, 2 及び Fig. 1 の Spot K は紫の螢光を有し、アルデヒド試薬で黄色を呈し、ニンヒドリン、ジアゾ反応は陰性で、この濾紙を空气中に放置しておくと K の部分は褐色を呈してくる。

これらの性質は anthranil 酸のそれに全く一致している。この K は w_1 の尿に見出されるが、 w_2 及び正常系の尿には時に極微量認められる程度である。 rb の尿には全くみられない。

しかし尿を塩酸で加水分解すると、 w_2 及び正常系の尿にも明瞭に現われてくる。そのさい Spot G が消失する。この G は R_F 0.78 で (以下特記しない R_F 値はブタノール・醋酸・水のものを示す)、ペーパークロマトグラムに相当大きい明瞭なスポットとして現われ、その量はかなり多いものと思われる。紫の螢光を有し、アルデヒド反応で黄色を呈し、ニンヒドリン、ジアゾ反応は陰性である。これらの性質から一応 anthranil 酸の誘導体と考えられる。

られるものを一応トリプトファン代謝物質とみなして選り出した (Table 1, 2, Fig. 1)。

なお呈色反応は次の方法によつた。

EHRlich のアルデヒド反応 5% HCl に dimethylamidobenzaldehyd を約 2% とかし、それに H_2O_2 を少量加えた液を濾紙に噴霧し、呈色せしめた。物質によつて現れる色調及び呈色状態を Table 3 の如く異にするので、それらを知ることによつて大体の構造を推察することが出来る。この試薬は毎日新しく調製する必要がある。

PAULY のジアゾ反応：いろいろの方法があるが、次の方法が最も安定して、しかも鋭敏に呈色した。第 1 液 (10% HCl に sulphanil 酸を 1% のわりにとかし) と第 2 液 (5% $NaNO_2$ 液) の両液を冷却しておき、両者をそれぞれ 2 cc あて混合して、約 15~30

分冷蔵庫中に放置し、しかるのちに 1 N NaOH を 10 cc 加えて用いる。調製して時間がたつと鋭敏度が低下する。この方法によれば従来の方法で検出出来なかつた微量の物質を確認することが出来た。

Anthranil 酸及び Anthra-

次に G を次の方法によつて抽出精製した。クロマトパイル法により正常系の尿をブタノール・醋酸・水で展開し、該当蛍光部分を 80% メタノールで抽出し、それをブタノール・ベンゾール・メタノール・水 (1 1 2・1) で帯状に展開し、該当部分を前と同様に抽出し、更に 5% 醋酸ソーダで展開した。そして吸収スペクトルの測定に供するものは該当部を pH 7.2 磷酸緩衝液で、その他の実験に供するものは 80% メタノールで抽出した。濾紙は全て前述した東洋濾紙 No. 51 を用いた。他の濾紙では不純物の影響がみられたが、この No. 51 を用いてはじめて満足する吸収スペクトルが得られた。

Fig. 2. Absorption Spectra of Substance G (I) and Anthranilic acid (II).

つて排泄されているわけである。

正常系の尿に anthranil 酸は極微量しか含まれていないのに、anthranilylglycine は多量に排泄されていることからみて、anthranil 酸は生理的に活性な物質で、ある程度以上蓄積すると害が現われるものと考えられる。

平田、吉川等はこの物質を卵の孵化時に認めているが、蛹の後期にも相当多量に排泄されていた。Kynurenine—anthranil 酸—anthranilylglycine の代謝経路は蚕のトリプトファン代謝の主要なルートをなしているものと考えた。

この anthranilylglycine は哺乳動物及び微生物では普通みられない物質だけに、昆虫のトリプトファン代謝経路の違いを示すものとして興味がある。この物質は anthranil 酸と同様に *rb* には全く含まれていない。

w_1 の尿には上記の物質のほかに紫の蛍光を示す物質が R_F 0.60 に極微量みられる。 w_2 、正常系の尿では普通みられないが、これらの蛹に anthranil 酸を注射すると現われてくる。この物質はアルデヒド反応で黄色を呈し、ニンヒドリン、デアゾ反応とも陰性である。加水分解すると anthranil 酸が出来るので、anthranil 酸の抱合体である。以上の成績からみて、これは MASON⁽⁷⁾ の示した anthranil 酸の glucuronide ではないかと考えている。

3-Hydroxykynurenine の Sulphate, Glucuronide の同定

A, B のスポットは正常系及び w_2 の尿では時に極微量認められる程度であり、 w_1 には全く含まれていないが、*rb* の尿では明瞭にみられる。黄緑色の蛍光を有し、ニンヒドリン、アルデヒド反応は陽性である。加水分解すると共に OH-kynu が出来る。B は容易に加水分解されるが、A は困難である。0.2 N HCl で 95°, 1 時間の加熱では A はほとんど分解されないが、B は OH-kynu に変化する。6 N HCl を用いて封管中で 100°, 2 時間分解すると A も分解される。

Fig. 3 は正常系の尿を濾紙電気泳動 (250 V, 10 時間) にかけたものを、更に 2 次的にブタノール・醋酸で展開したものである。B は酸性が強く、A も酸性物質として行動していることがわかる。このことはイオン交換性樹脂による処理によつてもみられた。また B の加水分解液中には $BaCl_2$ で沈澱する物質がみられた。

これらの成績から、B は OH-kynu の sulphate (II) と同定

G の吸収スペクトル (pH 7.2 0.1 M 磷酸緩衝液) は Fig. 2 の如くで、anthranil 酸とよく似ていた。

また 3 N HCl で 5 時間加水分解して、その生成物を調べたところ、K すなわち anthranil 酸と全く一致する物質と、ニンヒドリンで呈色する R_F 0.28 の物質を得た。この R_F 0.28 の物質はフェノール、コリジン等の溶媒を用いての PC により、グリシンであることを知った。

また anthranil 酸とグリシンから anthranilylglycine を合成して同定した結果からも、G は anthranilylglycine であることがわかった。すなわち anthranil 酸がグリシンと結合して、一種の抱合体とな

Fig. 3. Distribution of the Metabolites on Electrodialysis.

し、A は DALGIESH⁽⁸⁾ の示す OH-kynu の glucuronide (I) と推定した。

この両物質が正常系及び w_2 の尿では極めて少ないのに対し、 rb の尿に多いのは、 rb では OH-kynu が異状に蓄積するので⁽⁹⁾、その解毒のためこのような抱合体が形成され、排泄されるものと考えられる。

3-Hydroxyanthranil 酸の同定

J は青紫の螢光を有し、アルデヒド反応は黄色、ジアゾ反応は褐色を呈し、ニンヒドリン反応は陰性で、濾紙を放置してお

くと J の部分は褐色をおびてくる。これは合成した 3-hydroxyanthranil 酸と一致しており、2 次元の PC で検定した結果も、両者は全く一致することを示した。

なおこの物質は正常系及び w_2 の尿には含まれているが、 w_1 及び rb の尿には全然含まれていない。この物質が w_1 の尿に存在しないことは、OH-anthranil 酸が OH-kynu から導かれていたことからみて当然のことである。

rb の尿に OH-anthranil 酸が存在しないことは、前述した anthranil 酸及びその抱合体を含まないことと関連があり、 rb 遺伝子は kynurenine から anthranil 酸及び OH-kynu から OH-anthranil 酸への代謝を阻害しているものと考えられる。すなわち両代謝を支配する kynureninase を規制している遺伝子と推定した。

なお最近妹尾等⁽¹⁰⁾は w_2 の卵が孵化するさい及び蛹尿中に 3-hydroxyanthranilylglycine がみられたと報告しているが、著者の実験ではその物質の含量が少ないためか見出すことが出来なかつた。少なくとも、 w_2 に於ても anthranilylglycine 程の量は含まれていないということは出来る。

摘 要

トリプトファン代謝に関係を持つ第 1 白卵、第 2 白卵、赤赤等の突然変異を用いて、蚕のトリプトファン代謝を追究した。そして正常系の蚕の代謝物質として anthranil 酸、anthranilylglycine、3-hydroxykynurenine の sulphate、同 glucuronide、3-hydroxyanthranil 酸を確認した。

- (1) 吉川秀男 生物学の進歩, 3, 共立出版, 東京 (1948).
- (2) 平田, 岩崎, 吉川: *Intermediate Reports of Synthetic Research G.*, No. 4009, 1 (1952).
- (3) 市原硬: 遺伝生化学研究班報告, 3(1952).
- (4) A. BUTENANDT, P. KARLSON, and W. ZILLIG *Z. physiol. Chem.*, 288, 125 (1951).

- (5) 稲神馨, 赤城雅次: 日蚕誌, 23, 225(1954).
- (6) K. INAGAMI: *Nature*, 174, 1105(1954).
- (7) M. MASON: *J. Biol. Chem.*, 201, 513 (1953).
- (8) C. E. DALGLIESH: *Biochem. J.*, 52, 3 (1952).
- (9) K. INAGAMI et al. *Nature*, 173, 583 (1954).
- (10) 妹尾, 関, 吉川 日化, 74, 251 (1953).

Summary

Tryptophan metabolism of both normal and mutated silkworms were studied, and anthranilic acid, anthranilylglycine, sulphate of 3-hydroxykynurenine, glucuronide of 3-hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid were detected in the urine of the normal silkworm pupae.